

THES
BIBLIOTHEK
DER
UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

WÜRZBURG

1968

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. P. R. Seeliger

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Cryptococcus
neoformans* in Tauben- und anderen Vogelexkrementen
in Würzburg und Umgebung.**

Inaugural-Dissertation

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gerd Bethäüßer
aus Großbrinderfeld

Würzburg 1968

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. H. P. R. Seeliger

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Cryptococcus
neoformans* in Tauben- und anderen Vogelexkrementen
in Würzburg und Umgebung.**

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gerd Bethäuer
aus Großrinderfeld

Würzburg 1968

Referent: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

Für die Promotion:

Geprüft mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung und Fragestellung.	Seite 1
II. Material und Methodik.	5
III. Eigene Untersuchungen.	11
A: Nachweis von C.neoformans in den gesammelten Vogelkotproben.	11
B: Bestimmung des Keimgehaltes der Luft an Sproß- und Schimmelpilzen in einem C.neoformans-haltigen Taubenschlag.	13
C: Differenzierung der gefundenen Sproßpilzstämmе.	19
D: Nachweis der Kapselbildung durch C.neoformans.	25
1. Kapselnachweis im mikroskopischen Präparat.	25
2. Kapselreaktion nach Neufeld.	27
IV. Diskussion.	28
V. Zusammenfassung.	36
VI. Literaturverzeichnis.	38



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0066

UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN VON CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS
IN TAUBEN- UND ANDEREN VOGELEKKREMENTEN IN WÜRZBURG UND
UMGEBUNG.

I. EINLEITUNG.

Cryptococcus neoformans ⁺ ist der Erreger der Cryptococcose, einer beim Menschen meist tödlich verlaufenden Sproßpilz-Erkrankung. Er wurde 1894 erstmals von Busse (5) und Buschke (4) beschrieben. Seit dieser Zeit wurden Nachforschungen über den Standort dieses pathogenen Pilzes in der freien Natur angestellt.

Nachdem 1950 Emmons als Erster über das Vorkommen von C.neof. in Erdproben berichtete, gelang es dem gleichen Autor 1955, C.neof. aus Taubenexkrementen in Washington/USA zu isolieren (7). Daß C.neof. gerade in Taubenexkrementen bevorzugt aufzufinden ist, wurde in der Folge in anderen Staaten der USA (1, 10, 11) und anderorts, z.B. Japan (40), Australien (9), Brasilien (27), England (14, 17), Schweden (3) und Deutschland (25, 28, 29) bestätigt.

In der Weltliteratur (11,12,21,25,36) finden sich rund 1500 menschliche Erkrankungen durch diesen Sproßpilz beschrieben.

Die häufigste Verlaufsform der Cryptococcose ist gekennzeichnet

⁺im Verlauf der Arbeit abgekürzt als C.neof.

durch Befall des Zentralnervensystems und der Hirnhäute.

In Lunge, Leber, Niere, Nebenniere, Milz und Knochen konnte C.neof. bei ca. 50 % der an Cryptococcose Verstorbenen nachgewiesen werden. Differentialdiagnostisch müßte bei Meningitiden unklarer Genese und bei Erkrankungen der Lunge immer an Cryptococcose gedacht werden. Die Diagnose "Cryptococcose" kann als sicher gelten, wenn der Nachweis der bekapselten C.neof.-Zelle im Gewebe erbracht werden kann. Die Cryptococcose wird heute allgemein zu den Inhalationsmycosen gerechnet. Der erste Organbefall, in Form kleiner Granulome, die klinisch nicht unbedingt in Erscheinung treten, findet sich in der Lunge. Nachdem trockener Vogelkot eindeutig als Standort für C.neof. gilt, mußte staubförmiger Vogelkot als Infektions- bzw. Inhalationsquelle diskutiert werden. Soweit aus der Weltliteratur zu entnehmen war, wurden bisher noch keine systematischen Untersuchungen über den Gehalt des Staubes an C.neof. in Räumen, in denen Tauben nisten, angestellt. Die Verfahren zum Nachweis von C.neof. in Tauben- bzw. Vogelkot, Staub, Erdreich oder Vogelfutter, wie sie bisher Verwendung fanden, waren entweder sehr aufwendig (Mäuseversuch) oder noch nicht hinreichend zuverlässig, um das Vorhandensein selbst kleinerer Mengen dieser

Pilzart im Kulturversuch aufzuzeigen.

Da sich das Koloniebild von *C.neof.* auf Sabouraud-Glucose-Agar in Farbe, Größe und Konsistenz kaum von dem Bild anderer Sproßpilzarten unterscheidet, war lange Zeit das Erkennen von *C.neof.* in einem Sproßpilzmischrasen sehr erschwert. Die 1962 erfolgte Beschreibung des Braunfarbeffektes (BFE) von *C.neof.*-Kolonien auf Negersaat-Kreatinin-Agar⁺ (NKA) durch Staib (31) brachte endlich die Möglichkeit, diesen Sproßpilz auf Grund der spezifischen Verfärbung seiner Kolonien auf NKA in einem Pilzmischrasen sicher zu erkennen.

Durch Zusatz von Antibiotika und Diphenyl zu dem oben angegebenen Grundsубstrat konnten 1965 Staib und Seeliger (38) das Wachstum von Bakterien und Schimmelpilzen hemmen, ohne gleichzeitig das Wachstum der Sproßpilze wesentlich zu beeinträchtigen.

Daraus ergab sich die Möglichkeit, allein mit diesem Nährboden, unter Verzicht auf den biologischen Versuch an der weißen Maus, *C.neof.* aus stark verunreinigten Materialien isolieren zu können. Die Aufgabe vorliegender Arbeit besteht nun darin, das Vorkommen von *C.neof.* in Tauben- und anderen Vogelexkrementen in Würzburg und Umgebung mit Hilfe dieses neuen Selektiv- und Differential-

⁺ Frucht der Komposite *Guizotia abyssinica*

nährbodens zu untersuchen und dabei auch den Wert dieses neuen Verfahrens für die Cryptococcose-Diagnostik zu überprüfen.

Die Notwendigkeit dazu ergab sich aus den in Deutschland, im Gegensatz zu anderen Ländern (1,3,9,10,11,14,40), fehlenden gezielten epidemiologischen Untersuchungen über das Vorkommen von C.neof. im Taubenkot, nachdem Staib (28,29) erste umfangreiche Untersuchungen über das Vorkommen von C.neof. im Vogelkot durchgeführt hatte (er untersuchte Kotproben von 206 Vogelarten). Erste Nachweisversuche in dieser Richtung, wie sie in Köln (15) und Hannover (19) vorgenommen wurden, waren mißglückt.

Über die Suche von C.neof. in Taubenfäcalien hinaus sollte unter Verwendung des neuen Selektivmediums zum C.neof.-Nachweis dem Vorkommen dieses Sproßpilzes im Staub besondere Beachtung geschenkt werden.

II MATERIAL UND METHODIK.

A: Untersuchung der Kotproben.

Insgesamt wurden 1000 Kotproben von Tauben- und anderen Vogelarten auf die Anwesenheit von C.neof. untersucht.

1. Die Proben wurden in der Zeit vom 15.5.1966 bis 15.10.1966 an folgenden Orten gesammelt (Tab. 1):

Tab. 1 : Übersicht über die Herkunft der Proben

Orte	Anzahl der gesammelten Proben
Würzburg	550
Höchberg	160
Heidingsfeld	20
Veitshöchheim	40
Kist.	40
Waldbrunn	70
Waldbüttelbrunn	80
Eisingen	40

2. Die Exkremeate stammten von folgenden Vogelarten:

Tab. 2 : Übersicht über die untersuchten Vogelarten.

Vogelart	Anzahl der untersuchten Proben
verwilderte Taube	
/ Haustaube	325
\ Brieftaube	615
Kanarienvogel	40
Wellensittich	10
Papagei	10

3. Verarbeitung der gesammelten Proben:

Ca. 5 g Vogelkot wurde mit einer Pinzette in sterile Reagenzgläser gefüllt, mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und nach dem Aufweichen mit einem Holzstäbchen homogenisiert. Die so vorbehandelten Proben wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 26° C. 4 Stunden lang bebrütet. Da die Vermehrung von C.neof. im hochkonzentrierten Harn-Kot-Gemisch nur für wenige Stunden höher liegt, als die der Bakterien (30), wird durch diese kurze Vorbebrütung die Wahrscheinlichkeit, nur wenige C.neof. Zellen in einer der Proben nachzuweisen, vergrößert. Danach wurden von jeder Aufschwemmung zwei Normalösen Untersuchungsmaterial auf Negersaat-Kreatinin-Antibiotika-Diphenyl-Agar (NKAD) verimpft und fraktioniert ausgestrichen. Die so beimpften Medien wurden 12 Tage bei 26° C. aufbewahrt. Im Abstand von 24 Stunden wurden die Kulturen auf Braunfärbefekt als Hinweis für das Wachstum von C.neof. überprüft. Von sämtlichen Sproßpilzkolonien, die auf NKAD-Substrat eine braune Pigmentierung zeigten, wurden Subkulturen auf Negersaat-Kreatinin-Substrat und Bierwürze-Agar angelegt und anschließend bei 26° C. und 37° C. 3 bis 6 Tage lang bebrütet.

B: Untersuchung über den Gehalt der Luft an Sproß- und Schimmelpilzen in einem C.neof.-haltigen Taubenschlag.

In 2 großmaschigen Drahtkäfigen mit einer Maschenweite von ca. 2 cm wurden drei mit verschiedenen Nährböden beschickte Petrischalen offen aufgestellt. In Zeitabständen von 5 min. wurde ein solcher Plattensatz entnommen. Die Gesamtbeobachtungszeit betrug 1 Stunde. Danach wurden die Platten bei einer Temperatur von 26° C. bebrütet und nach jeweils 24, 48 und 72 Std. die Anzahl der gewachsenen Pilzkolonien bestimmt.

C: Nährböden.

Die Vogelexkremente wurden auf dem NKAD-Selektivnährboden untersucht.

Nährbodenrezept:

Glucose	10 g
Kreatinin	1 g
KH_2PO_4	1 g
Negersaat	50 g
Agar	15 g
Aqua dest.	1000 ml

Nach 20 min. Kochen wird das Ganze filtriert und danach 30 min. im Autoklaven bei 110°C . sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 50°C . erfolgt der Zusatz von Antibiotika und Diphenyl in folgenden Mengen:

Chloramphenicol	1 mg/ml
Streptomycin	40 E/ml
Penicillin	20 E/ml
Diphenyl	0,1 %

Anschließend wird der Nährboden in sterile Petrischalen gegossen.

Die Keimzahlbestimmung der Luft wurde mit folgenden Nährböden durchgeführt:

1. NK-Substrat, Rezept wie oben ohne Antibiotika und Diphenyl.
2. NKAD-Substrat.
3. Bierwürze-Agar.

D: Untersuchung der auf C.neof. verdächtigen Kolonien.

1. Mikroskopische Untersuchung.

Von jeder Sproßpilzkolonie, die auf dem oben angegebenen Nährboden einen Braunfarbefeekt (BFE) hervorrief, wurde ein Nativpräparat angefertigt, um so C. neof.-Zellen an Hand von Größe und Form zu finden (13,18).

2. Wachstum bei verschiedenen Temperaturen.

Von verdächtigen Kolonien wurden Subkulturen auf Bierwürze- und NK-Agar angelegt und diese bei 26°C . und 37°C . bebrütet.

3. Beurteilung und Prüfung von verdächtigen Kulturen mit Braunfarbeffekt (BFE).

Von allen braunfarbenen Sproßpilzkolonien, die sich auf dem Pilzmischrasen der Originalplatte zeigten, wurden Subkulturen auf NK-Agar angelegt. Zeigten die Sproßpilzkolonien auch hier deutlich eine braune Pigmentierung, wurden sie nach 48 Std. Vorkultur bei 26°C. biochemisch weiter differenziert:

a) Zuckervergärung.

aa) Methode nach Durham.

ab) Methode nach Lodder und Kreger van Rij.

ac) Geprüfte Zucker: Glucose, Maltose, Laktose, Saccharose, Galaktose.

ad) Ablesung der Ergebnisse: nach 2-7 Tagen

b) Assimilationsprüfung nach der Methode von Beijerinck (2) :

ba) Zuckerassimilation: geprüfte Zucker wie unter 5 ac.

bb) Stickstoffassimilation: geprüfte Substanzen: KNO_3 und Kreatinin.

c) Harnstoffhydrolyse.

Die Harnstoffhydrolyse wurde auf dem Harnstoffagar nach Christensen (6) durchgeführt. Dieser setzt sich zusammen aus:

Urea	2 %
Pepton	0,1 %
Glucose	0,1 %
NaCl	0,5 %
KH_2PO_4	0,2 %
Agar	1,5 %

Als Indikator dient Phenolrot 0,012 g/1000 ml. pH = 6,8.

Nach dem Beimpfen mit 48 Stunden alten Kulturmateriel wurde das Substrat bei 26° C. bebrütet. Der Beginn der Harnstoffhydrolyse wurde durch einen Farbumschlag des Indikators von orange-gelb nach dunkelrot angezeigt.

4. Prüfung der Austrocknungsresistenz von fraglichen C.neof.-Kulturen.

Flußsand wurde gewaschen, getrocknet und danach eine halbe Stunde bei 110° C. autoclaviert. In sterilen Reagenzgläsern wurden ca. 10 g Sand mit 0,5 ml einer dichten Aufschwemmung (ca. 2×10^6 Zellen/ml) der verdächtigen Stämme benetzt. Dieser Sand wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wurden von jeder Probe einige Sandkörner auf NK- und Bierwürze-Agar ausgestreut. Die Platten wurden 10 Tage bei 26° C. bebrütet.

E: Tierversuche.

48 Stunden altes Kulturmateriel mit deutlichem BFE wurde in steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt (Keimdichte ca. 2×10^6 Zellen/ml). Versuchstier: weiße Maus. Die Injektionsmenge betrug 0,5 ml intraperitoneal. Zusätzlich wurde je eine Maus intramuskulär in den linken Oberschenkel infiziert (Injektionsmenge 0,2 ml). Die Beobachtungszeit für die Versuchstiere betrug 1 Monat. Die nach diesem Zeitraum noch lebenden Tiere wurden getötet und, wie unter III D beschrieben, untersucht. Bei den intraperitoneal infizierten Mäusen wurde die Bauchhöhle mit formolisierter physiologischer Kochsalzlösung gespült, um so die sich im Peritonealexsudat befindlichen C.neof. Zellen zu gewinnen. Das Exsudat wurde im Kühlschrank aufbewahrt und diente späteren serologischen Untersuchungen.

Nach Öffnen der Bauchhöhle wurden Lymphknoten der vorderen Gekrösewurzel herauspräpariert und hiervon Quetschpräparate hergestellt.

Mit Hilfe eines Meßokulars erfolgte bei den nachgewiesenen C.neof.-Zellen die Bestimmung von Zellgröße und Kapseldicke. Von den Quetschpräparaten der Gekröselymphknoten wurden außerdem Dauerpräparate in einem Kunstharzpräparat ("Eukitt") hergestellt. Bei den intramuskulär infizierten Mäusen wurde der linke Oberschenkel freipräpariert und von dem infizierten Muskelgewebe ebenfalls ein Quetschpräparat zum Nachweis der bekapselten C.neof.-Zellen angefertigt (3).

Wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen eine andere Methode angewendet als hier beschrieben, so wird sie dort gesondert angeführt.

III. EIGENE ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN.

A: Nachweis von *Cryptococcus neoformans* in den gesammelten Vogelkotproben.

Methodik: Die Verarbeitung der Proben erfolgte wie unter II A angegeben. Als Selektivnährboden diente das unter II C angegebene Substrat.

Befunde: (Tab.3) In den 1000 gesammelten Vogelkotproben konnte 19 mal (ca. 2%) *C.neof.* allein mit Hilfe des Braunfarbeffektes (BFE) auf NKAD-Agar nachgewiesen werden.

Tab. 3 : Übersicht über Herkunft, Anzahl und positive Befunde.

Herkunft der Proben	Anzahl der Proben	Anzahl der pos. Proben
Würzburg	550	17
Höchberg	160	2
Heidingsfeld	20	-
Veitshöchheim	40	-
Kist	40	-
Waldbrunn	70	-
Eisingen	40	-

Die positiven Proben stammten von folgenden Vogelarten:

Tab. 4 : Übersicht über die Herkunft der positiven Proben.

Vogelart	Anzahl der pos. Befunde	Herkunft
verwilderte Taube	2	Würzburg (2)
Brieftaube	15	Würzburg (2) Höchberg (1)
Kanarienvogel	1	Würzburg (1)
Wellensittich	1	Würzburg (1)

Diese Befunde zeigen, daß C.neof. in ca. 2 % aller untersuchter

Proben nachgewiesen werden konnte.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß z. B. in Würzburg die 17 positiven Befunde an 4 verschiedenen Stellen der Stadt (zweimal bei verschiedenen Brieftaubenzüchtern, einmal in einer Vogelhandlung und einmal in Taubennistplätzen an Ruinen der alten Universität) erhoben wurden. Bei der Wiederholung der Untersuchungen an diesen Fundstellen. wäre sicher ein wesentlich höherer Prozentsatz an positiven Proben gefunden worden.

B: Bestimmung des Keimgehaltes der Luft an Sproß- und Schimmelpilzen in einem C.neof.-haltigen Taubenschlag.

Methodik: Petrischalen, die mit verschiedenen Nährböden beschickt waren (II C), wurden, wie unter II B beschrieben, in Zeitabständen von 5 min bis zu einer Stunde im Taubenschlag aufgestellt. Der Raum war ca. 45 m^3 groß und in ihm befanden sich ca. $1,5 \text{ m}^3$ 1 Jahr alter trockener Taubenkot. Während den Untersuchungen befanden sich ca. 60 Tauben in dem Schlag.

Ergebnis und Ergebnisbesprechung:

Tab. 5 : Anzahl der Sproßpilzkolonien auf den verschiedenen Nährböden.

Expositionszeit von je 2 Platten	Koloniezahl auf		
	NK Agar	NKAD Agar	Bierwürze-Agar
5 min	90	11	140
10 min	150	12	225
15 min	230	15	250
20 min	255	15	verschimmelt

Die Auszählung der Koloniezahl erfolgte nach 48 stündiger Bebrütung bei 26°C . Waren die NK- und Bierwürze-Agar-Platten länger als 20 min. offen aufgestellt, ließen sich die einzelnen Sproßpilzkolonien wegen der starken Verschimmelung nicht mehr auszählen. Nur die

NKAD-Agar-Platten konnten vollständig ausgezählt werden und wurden deshalb gesondert aufgeführt.

2. Keimgehalt der Luft an Schimmelpilzen (Tab. 6)

Tab. 6 : Anzahl der Schimmelpilzkolonien auf den verschiedenen Nährböden.

Expositionszeit der Platten	Koloniezahl auf		
	NK-Agar	NKAD-Agar	Bierwürze-Agar
5 min	15	1	20
10 min	25	1	29
15 min	35	4	55
20 min	33	3	65

3. Die Platten, die mit NKAD-Agar beschickt waren, wurden 7.7
bei 26°C. bebrütet und danach ausgekühlt.

Tab. 7 : Pilzkolonien auf dem Differentialnährboden.

Expositionszeit des NKAD-Substrates	Koloniezahl der Sproßpilze	Koloniezahl der Schimmelpilze
5 min.	25	14
10 min.	47	21
15 min.	120	37
20 min.	150	50
25 min.	170	60
30 min.	130	70
35 min.	120	82
40 min.	120	82
45 min.	140	82
50 min.	120	82
55 min.	120	82
60 min.	120	82

Aus diesem Ergebnis läßt sich ersehen, daß das Wachstum der Schimmelpilze erheblich, das der Sproßpilze aber nur geringgradig gehemmt ist.

Da sich während der Untersuchung ca. 60 Tauben in dem Taubenschlag aufhielten, war die Luftturbulenz und damit die Staubaufwirbelung je nach dem Verhalten der Tiere recht unterschiedlich. Dies erklärt die Tatsache, daß die Koloniezahl nicht mit zunehmender Expositionszeit kontinuierlich ansteigt.

4. C.neof.-Kolonien auf den Selektivnährböden (Tab. 8)

Bei den angeführten Untersuchungen konnten auf den mit NK-Agar beschickten Platten Sproßpilzkolonien gesehen werden, die einen deutlichen Braunfärbefekt zeigten (Tab. 8).

Tab. 8 : Anzahl der Sproßpilzkolonien mit BFE auf NK-Agar.

Expositionszeit der Platten	Nährboden NK-Agar	Kolonien mit BFE
10 min	"	2
25 min	"	3
30 min	"	6
35 min	"	1
40 min	"	4
45 min	"	10
55 min	"	11
60 min	"	3

Auch auf 2 Platten, mit NKAD-Agar beschickt, wurden nach einer Bebrütungszeit von 10 Tagen bei 26°C. braune Sproßpilzkolonien beobachtet.

Die bei diesen Untersuchungen gefundenen Sproßpilzstämmen wurden wie die aus den Taubenkotproben isolierten Stämme weiter differenziert.

Der Keimgehalt der Luft an Sproßpilzen lag, wie die Versuche zeigten, 6mal höher als der Gehalt an Schimmelpilzsporen. Die am häufigsten vorkommenden Schimmelpilze waren:

- a) Phycomyceten
- b) Dematiaceen
- c) Penicillium
- d) Aspergillus (vereinzelte)

Bei den Sproßpilzen war der Anteil der wachstumsfähigen C.neof.-Zellen verhältnismäßig hoch. Nach einer Expositionszeit von 25 min bis zu einer Stunde wurden regelmäßig C.neof.-Kolonien auf NK-Agar nachgewiesen.

5. Untersuchungen zum Nachweis von C.neof. im Sputum eines Menschen, der sich über längere Zeit an einem mit C.neof. versuchten Ort aufhält.

Methodik: Während eines Aufenthaltes von einer Stunde in dem mit C.neof. befallenen Taubenschlag wurden von dem Brieftaubenzüchter und dem Untersucher selbst Sputum an Ort und Stelle auf NK-Agar gebracht und wie üblich ausgestrichen. Die Platten wurden bis zu 10 Tagen bei 26°C. bebrütet.

Ergebnis: Bei der hier untersuchten Person handelte es sich um einen 72 jährigen Mann, der seit seiner Kindheit Brieftauben züchtete.

Weder er noch jemand von seinen Familienangehörigen ist bis heute sichtbar an Cryptococcose erkrankt (s. hierzu Staib, Kanarienvogelzüchter, 36). Auf allen Platten entwickelte sich ein dichter Sproßpilzmischrasen, dazwischen ganz vereinzelt Schimmelpilzkolonien. C.neof. konnte von keiner dieser Platten isoliert werden.

C. Differenzierung der gefundenen Sproßpilzstämmе.

Methodik: Sowohl die aus dem Vogelkot isolierten als auch die bei der Luftuntersuchung gefundenen Stämme wurden genau überprüft.

Wie unter II D beschrieben, wurden die allgemein anerkannten Untersuchungsmethoden für C.neof. durchgeführt.

Ergebnis und Ergebnisbesprechung:

1. Mikroskopisch sah man in allen Nativpräparaten Sproßzellen von kreisrunder bis leicht ovaler Form (13, 18). Der Durchmesser betrug zwischen 5 μ und 10 μ .
2. Da C.neof. im Gegensatz zu anderen Cryptococcus-Arten bei 37°C. üppiges Wachstum zeigt, wurden von allen Stämmen Kulturen auf Bierwürze-Agar und auf NK-Agar angelegt und diese 48 Std. bei 37°C. bebrütet. Alle Stämme entwickelten sich bei dieser Temperatur gut.

3. Alle isolierten Stämme zeigten auf NK-Agar einen deutlichen BFE.

Die Intensität der Pigmentierung variierte bei den einzelnen Stämmen jedoch recht erheblich (32).

4. Biochemische Merkmale:

a) Fermentation: Keiner der BFE-positiven Stämme war in der Lage Glucose unter Gasbildung zu vergären (Tab. 9).

b) Assimilation: Alle Stämme zeigten bei Assimilationsversuchen mit verschiedenen Zuckern einheitliche Eigenschaften (Tab. 10).

Glucose, Maltose, Saccharose und Galaktose wurden assimiliert, während Laktose nicht assimiliert wurde. Die Assimilation von Galaktose war bei allen Stämmen am schwächsten.

KNO_3 -Assimilation: Kein Stamm war in der Lage, KNO_3 zu assimilieren.

Kreatinin-Assimilation: Die isolierten Stämme assimilierten alle Kreatinin (34). Das Auxanogramm variierte jedoch bei den einzelnen Stämmen in Größe und Dichte recht erheblich (Tab. 9).

c) Harnstoffhydrolyse: Alle Stämme zeigten eine rasche Harnstoffhydrolyse (24). Der Beginn des Farbumschlages zeigte sich bei einem Stamm schon nach 5 Stunden und war bei allen Stämmen nach 24 Stunden abgeschlossen (Tab. 9).

5. Die in getrocknetem Flußsand 6 Monate lang aufbewahrten Stämme wurden auf Bierwürze- und NK-Agar gebracht. Nach 48 stündiger Bebrütung bei 26°C. zeigten alle Stämme üppiges Wachstum und BFE(33).

Folgerung: Nach den oben angegebenen Ergebnissen darf es als sicher gelten, daß es sich bei den gefundenen Stämmen um C.neof. handelt.

Tab. 9 : Differenzierungsmerkmale der gefundenen C.neof. Stämme.

			Gärung	N-Assimilation		
Stamm Nr.	EFE	37°C.	Glucose	KNO ₂	Kreatinin	harnstoffhydrolyse
20	+	+	-	-	++	+
239	+	+	-	-	+++	+
258	+	+	-	-	+	+
380	+	+	-	-	+	+
393	+	+	-	-	+++	+
722	+	+	-	-	+	+
723	+	+	-	-	++	+
750	+	+	-	-	+	+
751	+	+	-	-	+	+
785	+	+	-	-	+	+
786	+	+	-	-	+	+
795	+	+	-	-	+++	+
796	+	+	-	-	++	+
797	+	+	-	-	+	+
807	+	+	-	-	+	+
808	+	+	-	-	+	+
810	+	+	-	-	+++	+
862	+	+	-	-	++	+
863	+	+	-	-	+	+
2	+	+	-	-	+	+
5	+	+	-	-	+	+
6	+	+	-	-	+++	+
7	+	+	-	-	+++	+
8	+	+	-	-	+	+
9	+	+	-	-	++	+
11	+	+	-	-	+++	+
12	+	+	-	-	+++	+
8	+	+	-	-	++	+
10	+	+	-	-	++	+

Zeichenerklärung zu Tabelle 9 :

+ = schwaches Auxanogramm

++ = lockeres Auxanogramm

+++ = dichtes Auxanogramm

+ = Stämme, die aus Kotproben isoliert wurden

++ = Stämme, die aus der Luftstaubuntersuchung auf N-K-S
isoliert wurden

+++ = Stämme, die bei der Luftstaubuntersuchung auf N-K-A+D-S
isoliert wurden

Tabelle 10 : Zuckerassimilationstest der gefundenen C.neof.-Stämme.

Stamm Nr.	Glucose	Maltose	Laktose	Saccharose	Galaktose
60	+	+	-	+	+
239	+	+	-	+	+
258	+	+	-	+	+
393	+	+	-	+	+
722	+	+	-	+	+
723	+	+	-	+	+
750	+	+	-	+	+
751	+	+	-	+	+
785	+	+	-	+	+
786	+	+	-	+	+
795	+	+	-	+	+
796	+	+	-	+	+
797	+	+	-	+	+
807	+	+	-	+	+
808	+	+	-	+	+
810	+	+	-	+	+
862	+	+	-	+	+
863	+	+	-	+	+
2	+	+	-	+	+
5	+	+	-	+	+
6	+	+	-	+	+
7	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	+
9	+	+	-	+	+
11	+	+	-	+	+
12	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	+
10	+	+	-	+	+

D. Nachweis der Kapselbildung durch die C. neof. - Infektion im Tier.

1. Kapselnachweis im mikroskopischen Präparat.

Methodik: Weiße Mäuse wurden wie unter II E beschrieben mit C.neof.

infiziert. Einige starben in den ersten Wochen, alle anderen wurden

nach einem Monat getötet. Die Kapselbildung wurde in Quetschpräpa-

raten von Mesenteriallymphknoten und Muskelgewebe geprüft (30).

Ergebnis: Bei allen Mäusen, die mit den zu testenden Stämmen infiziert

waren, konnten bekapselte C.neof.-Zellen sowohl im Mesenterial-

lymphknoten als auch im Muskelgewebe nachgewiesen werden. Der Kapsel-

durchmesser wurde mit Hilfe eines Meßokulars bestimmt.

Die in Tabelle 11 aufgeführten Meßergebnisse sind Durchschnittswerte,

aus je 10 gemessenen Zellen berechnet.

Tab. 11 : Durchmesser der bekapselten C.neof.-Zelle im Gewebe.

Stamm Nr.	Durch- messer	Stamm Nr.	Durch- messer	Stamm Nr.	Durch- messer
80	48 μ	786	37 μ	2	27 μ
239	38 μ	795	28,5 μ	5	38 μ
258	37 μ	796	30 μ	6	45 μ
300	45 μ	797	39 μ	7	40 μ
393	43 μ	807	34 μ	8	39 μ
722	45 μ	808	50 μ	9	45 μ
723	34 μ	810	44,5 μ	11	27 μ
750	43 μ	862	54 μ	12	45 μ
751	48 μ	863	53 μ	8	35 μ
785	34 μ			10	33 μ

Die Stämme der 1. und 2. Kolonne wurden aus Kotproben, die der

3. Kolonne aus Luftstaub isoliert.

2. Außerdem wurden Aufschwemmungen der auf Bierwürze-Agar gewachsenen *C. neoformans*-Stämme serologisch in der Neufeld-Reaktion auf das Vorhandensein von Kapseln geprüft. Hierzu standen Immunsere und die Faktorensere nach Evans zur Verfügung. Das Verhalten der Stämme war in diesen Sere unterschiedlich. Eine Agglutination trat in Gegenwart von C. neoformans-Serum stets auf und fehlte im Kontrollversuch mit Candida albicans-Serum. Nur ein Teil der Stämme (s. Tab. 12) gab eine ausgeprägte Kapselreaktion; bei den anderen, die sich durch eine erheblich weniger dicke Kapsel unterschieden, war diese Reaktion nicht eindeutig erkennbar, wenngleich die Konturen deutlicher in Erscheinung traten als in den Kontrollpräparaten.

Tab. 12 : Kapselreaktions- und Agglutinationstest mit den gefundenen C.neof.-Stämmen bei der Verwendung eines Immunserums von C.neoformans

Stamm-Nr.	Kapselreaktion	Agglutination	Stamm-Nr.	Kapselreaktion	Agglutination
80	++	+	808	+++	+
239	+	+	810	+++	+
258	+-	+	862	++	+
380	+	+	863	+++	+
393	++	+	2	-	+
722	+	+	5	+-	+
723	-	+	6	+++	+
750	+	+	7	+	+
751	++	+	8	+	+
785	-	+	9	+	+
786	+-	+	11	-	+
795	-	+	12	++	+
796	-	+	8	+	+
797	++	+	10	+-	+
807	+	+			

Zeichenerklärung:

- + = schwache Kapselbildung
- ++ = starke Kapselbildung
- +++ = sehr starke Kapselbildung
- +- = kaum erkennbare Kapselbildung
- = keine Kapselbildung

IV DISKUSSION.

Der Nachweis von C.neof. in Taubenexkrementen hat einen wichtigen Standort dieses pathogenen Hefepilzes in der freien Natur aufgezeigt. In den vergangenen 10 Jahren wurde das Vorkommen von C.neof. in Taubenkot von den verschiedensten Forschern (1,3,8,9,10, 11,14,17,20,25,27,29,40) in fast allen Erdteilen bestätigt. Auffallend ist jedoch, daß in Europa, wo Untersuchungen in England und in Schweden (14,17,3) mit Erfolg durchgeführt wurden, C.neof. nur ganz vereinzelt aus den Taubenkotproben isoliert werden konnte. In Amerika berichtete Emmons (8) und Littman und Schneierson (11) von einem Befall der Proben von 60 % beziehungsweise 35 %. In Deutschland fand Staib 1 mal C.neof. im Kot von Tauben bei Untersuchungen über das Vorkommen von C.neof. im Kot von verschiedenen Vogelarten. Seeliger und Staib (25) konnten in 30 untersuchten Proben der Stadt Frankfurt/Main 1 mal C.neof. nachweisen, während es Pieritz (15) in Köln und Bisping (19) in Hannover nicht gelungen ist, den Pilz in Taubenkotproben nachzuweisen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse waren ein Anlaß für die hier mitgeteilten epidemiologischen Untersuchungen im Raume Würzburg. Dabei sollte erstmals der von Staib und Seeliger (38) entwickelte NKAD-Agar bei größeren epidemiologischen Untersuchungen als

Hauptdifferenzierungsmittel verwendet werden, nachdem in den USA Shields und Ajello (26) bei diesbezüglichen Untersuchungen einen unabhängig entwickelten, fast analogen Nährboden mit Erfolg angewendet hatten. Auch dem nicht geübten Untersucher ist es möglich, C.neof.-Kolonien in einem dichten Pilzmischrasen auf diesem Selektivmedium zu erkennen. Auf diese Weise konnte aus 19 der 1000 untersuchten Proben C.neof. isoliert werden, was einer Ausbeute von ca. 2 % entspricht. Andere in Europa erfolgte Untersuchungen (3) zeigen einen geringeren Anteil an positiven Proben oder entsprechen in etwa diesen Ergebnissen (14). Daß in Köln und Hannover (15,19) C.neof. in Taubenkotproben nicht gefunden werden konnte, kann auf der von diesen Autoren angewandten Methode beruhen, mit der es wohl nur ausnahmsweise gelingt, die wenigen C.neof.-Zellen in größeren Keimgemischen selektiv nachzuweisen. Weitere Vorteile des NKAD-Agars sind darin zu sehen, daß in verhältnismäßig kurzer Zeit und mit geringem Aufwand große Mengen von Untersuchungsmaterialien auf das Vorkommen von C.neof. überprüft werden können. Wie aus den oben angegebenen Ergebnissen zu entnehmen ist, erwies sich dieser Selektivnährboden als geeignet, größere epidemiologische Untersuchungen über den Standort von C.neof. in der freien Natur durchzuführen.

Ein Nachteil der von uns angewandten Methode besteht darin, daß es,

wenn auch nur vereinzelt, C.neof.-Stämme gibt, die auf NKAD-Agar in der Primärkultur keinen Braunfarbefeekt zeigen. Da bei größeren epidemiologischen Untersuchungen von jeder Probe nur eine Kultur angelegt wird, werden diese Stämme also nicht miterfaßt. Bei unseren Untersuchungen wurden jedoch von allen verdächtigen Kolonien Subkulturen angelegt, auf denen sich jeder C.neof.-Stamm braun färbt (24a). Auf diese Weise wurde die Möglichkeit, C.neof.-Stämme zu übersehen, noch weiter eingeschränkt, so daß der mögliche Fehler im Endergebnis kaum ins Gewicht fallen dürfte. Die Tatsache, daß in den Exkrementen von verwilderten, im Freien nistenden Tauben C.neof. nicht so häufig nachzuweisen war wie im Kot von Brieftauben und anderen Stubenvögeln, bestätigt Untersuchungen von Staib (30), der feststellte, daß Vogelkot, mit Wasser versetzt, nur für etwa 24 Stunden ein Nährsubstrat für C.neof. darstellt. Danach kommt es, hervorgerufen durch bakteriellen Abbau der Exkremente, zu einer starken Alkalisierung des Vogelkots. Im alkalischen Milieu ist aber C.neof. nicht mehr wachstumsfähig (30). Da nun diese Gefahr des bakteriellen Abbaus in trockenen Räumen nicht in so starkem Maße gegeben ist, kann sich dort C.neof. über längere Zeit bei günstigen Substratbedingungen vermehren. Ein weiterer Grund, warum sich C.neof. gerade in trockenen Räumen häufiger findet, dürfte darin zu sehen sein,.

daß dieser Sproßpilz eine sehr hohe Resistenz gegen Austrocknung aufweist. Staib berichtete 1963, daß C.neof. nach einer Aufbewahrungszeit von 480 Tagen in getrocknetem Flußsand bei erhaltener Virulenz noch voll vermehrungsfähig war. Dies gab Veranlassung zu untersuchen, ob C.neof. im Staub der Luft in einem Taubenschlag nachzuweisen ist, in dem der Pilz aus Kotproben isoliert werden konnte. Die Ergebnisse waren positiv. Von den 24 der Luft und damit der Benetzung mit Staubpartikeln ausgesetzten Nährböden zeigten 10 C.neof.-Kolonien. Als Nährböden wurde bei diesen Untersuchungen NK-Agar und NKAD-Agar verwendet. Trotz der starken Verschimmelung der NK-Platten konnte von diesen wesentlich öfters C.neof. isoliert werden als von den NKAD-Platten. Hieraus ist zu ersehen, daß die Konzentration des Diphenyls in dem NKAD-Agar für diese Untersuchungen möglicherweise zu groß war und so eine geringgradige Wachstumshemmung von C.neof. verursachte. Während die C.neof.-Zelle in einem Keimgemisch, wie es bei der Untersuchung der Kotproben vorliegt, nie der vollen Diphenylkonzentration ausgesetzt ist und dort auch im Wachstum nicht eingeschränkt ist, kommt sie aus der Luft als einzelne Zelle auf den Nährboden und scheint bei der vorhandenen Diphenylkonzentration nur sehr beschränkt vermehrungsfähig zu sein. Weitere Untersuchungen müßten zeigen, bei welcher Diphenylkonzentration eine einzelne C.neof.-Zelle, die zudem infolge der Austrocknung in

ihrem Stoffwechsel stark eingeschränkt ist, noch gut wachstumsfähig wäre. Es erscheint allerdings fraglich, ob dann der Hauptzweck des Diphenyls im Substrat, die selektive Hemmung des Schimmelpilzwachstums, noch gewährleistet wäre.

Nachdem Emmons (7) Taubenkot als Standort für C.neof. in der freien Natur erkannt hatte, drängten sich ihm für die Möglichkeit einer Infektionsgefahr des Menschen durch C.neof.-haltigen Taubenkot erste Verdachtsmomente auf. In Deutschland berichteten Wiebecke und Staub (8) von der Möglichkeit einer Infektion Vogelkot → Mensch bei einem Cryptococcosefall in München. Staub konnte damals, schon 7 Monate vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome, C.neof. aus Stubenvogelmist, ca. 700 m von der Wohnung der Patientin entfernt, isolieren. Bisher wurde erst einmal, von Procknow und Mitarbeitern (16), in der Literatur ein Fall beschrieben, bei dem der Infektionsweg Taubenkot → Mensch als höchstwahrscheinlich anzunehmen ist.

Die Gefahr, daß ein Mensch, der sich über längere Zeit an einem mit C.neof. verseuchten Ort aufhält, vermehrungsfähige, virulente C.neof.-Zellen inhaliert, ist, wie aus den auf Seite 19 genannten Ergebnissen hervorgeht, gegeben. Trotzdem gelang der Versuch, C.neof. im Sputum exponierter Menschen nachzuweisen, nicht. Sputumproben von 2 Personen, die sich über eine Stunde an einem solchen Ort aufhielten, wurden auf

verschiedenen Nährböden (NK-Agar und Bierwürze-Agar) untersucht.

Die Platten zeigten zwar alle einen dichten Sproßpilzmischrasen,

C.neof. konnte jedoch nicht isoliert werden (s. Staib 36).

Dieser Befund deutet darauf hin, daß es möglicherweise erheblich stärkerer C.neof.-Mengen bedarf, um diese zum Nachweis beziehungsweise zum Haften zu bringen, wobei offenbar auch ganz spezielle Substratbedingungen gegeben sein müssen.

Durch diese Beobachtung wird die Ansicht bestätigt, daß ein gesunder Organismus einer Infektion durch C.neof. einen erheblichen Widerstand entgegensetzt.

Die hier genannten Befunde erlauben noch keine endgültige Stellungnahme.

Sie sind jedoch keinesfalls als zufallsbedingt anzusehen, da sie sich zwanglos in die noch lückenhaften Kenntnisse der Cryptococcose-Epidemiologie einfügen. Wichtig erscheint für eine Vertiefung unseres Wissens:

a) umfangreichere und über einen langen Zeitraum andauernde Sputumuntersuchungen an Menschen, die sich an gesicherten C.neof.-Standorten aufhalten. Dies würde vor allem Angehörige bestimmter Berufsgruppen (Vogelhändler, Taubenzüchter) betreffen.

b) serologische bzw. immunologische Untersuchungen an diesen .
gefährdeten Menschen.

Letzteres erscheint schon deshalb erforderlich, als kürzlich gezielte
serologische Kontrollen bei Taubenzüchtern mittels spezieller Methoden
erste sichere Beweise dafür geliefert haben, daß dieser Personenkreis
einen signifikant höheren Antikörpertiter zeigt (39).

Nach den heutigen Kenntnissen ist wohl kaum noch daran zu zweifeln,
daß die gesicherten Cryptococcose-Erkrankungen des Menschen nur einen
winzigen Bruchteil der tatsächlich erfolgten Infektionen ausmachen.
Offenbar erkranken an den progressiven Formen dieser Mykose nur solche
Personen, die an erheblichen Störungen der zellulären und humoralen
Abwehr leiden, z. B. bei Morbus Hodgkin, Retikulosen, Leukämien u.s.w.
Eine Parallele hierzu bildet die Nocardiose durch Nocardia asteroides.
Allerdings gibt es gelegentlich auch Cryptococcus-Infektionen an
Menschen, bei denen kein Grundleiden gefunden wird.

Ungeklärt bleibt, welche Mechanismen beim Gesunden ein Angehen der
unter bestimmten Verhältnissen unvermeidbaren Inokulation dieser
pathogenen Pilze verhindern. Hierfür könnte u. a. die Größe der Pilz-
zellen maßgeblich sein ($\varnothing$ über 5μ), wodurch die Pilze bereits in den
oberen Luftwegen abgefangen und wieder heraustransportiert werden.

Wahrscheinlich spielen auch die Art der Atmung (Nasen-Mundatmung) und die Menge der inhalierten Pilzzellen (ggf. auch anderer schädigender Staubbestandteile) eine Rolle. Die Bedeutung des CO_2 -Gehaltes in den Atemwegen für das Wachstum von *C. neoformans* ist ebenfalls zu erwägen. Schließlich ist auf Grund der oben erwähnten immunologischen Befunde (vgl. Übersicht bei Seeliger (24a)) erwiesen, daß es bei einem ganz beträchtlichen Hundertsatz ständig exponierter Personen zu einer serologisch und im Hauttest nachweisbaren Auseinandersetzung kommt. Dies kann nur als Infektionsfolge gedeutet werden, wobei zu vermuten ist, daß in der Regel die *Cryptococcus*-Infektion klinisch stumm bzw. subakut abläuft und entweder nicht bemerkt oder nicht erkannt wird, weil die zu erwartenden klinischen Erscheinungen im Bereich der oberen Luftwege mit keiner besonders auffallenden Symptomatik gekoppelt zu sein scheinen.

Ob allerdings die von Emmons vor Jahren schon postulierten Massenerkrankungen an Pneumonitis bei 23 amerikanischen Männern (8), die nach dem Abbruch eines alten Schulgebäudes erkrankten und seinerzeit als primäre pulmonale Histoplasmose-Infektion gedeutet wurde, tatsächlich *Cryptococcosen* waren, ist unbewiesen und erscheint im Licht der obigen Untersuchungen sogar zweifelhaft.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

1. In Würzburg und Umgebung wurden 1000 Exkrementproben von Tauben und Stubenvögeln gesammelt und mit Hilfe von Bierwürze-Agar, Neger-saat-Kreatinin-Agar und Neger-saat-Kreatinin-Antibiotika-Diphenyl-Agar auf die Anwesenheit von *C.neoformans* untersucht.

2. Auf Grund des Braunfarb-effektes konnte auf den oben genannten Nährböden in 1,9 % der Proben *C.neoformans* nachgewiesen werden.

15 der positiven Proben stammten von zwei Brieftaubenschlägen, zwei von verwilderten Tauben aus einer Kirchenruine, eine von einem Kanarienvogel und eine von einem Wellensittich in einer Vogelhandlung. Das Ergebnis entspricht anderen, außerhalb Deutschlands erhobenen Befunden (14,17).

3. In einem Taubenschlag, in dem *C.neoformans* wiederholt nachgewiesen wurde, wurden gezielte Untersuchungen über den Gehalt der Luft an Sproß- und Schimmelpilzen vorgenommen. In dem Luftstaub dieses Raumes wurden etwa 6 mal mehr Sproßpilze als Schimmelpilze nachgewiesen. Auf 10 der 24 exponierten Nährböden konnte *C.neoformans* nachgewiesen werden.

4. Nach einem 1-stündigen Aufenthalt von 2 Personen in einem Taubenschlag, in dem *C.neoformans* aus Taubenmist und Staub isoliert werden konnte, gelang aus mehreren Sputumproben die Isolierung

von *C. neoformans* nicht.

5. Alle aus den Vogelkotproben und bei den Luftstaubuntersuchungen isolierten *C. neoformans*-Stämme gaben auf Negersaat-Kreatinin-Agar einen Braunfarbeffekt. Im übrigen zeigten die isolierten Stämme mit den üblichen Nachweismethoden für *C. neoformans* typisches Verhalten. Alle Kulturen erwiesen sich als pathogen für die weiße Maus. Bei allen Stämmen fand sich eine starke Austrocknungsresistenz.

6. Die Kapselbildung wurde im lebenden Gewebe nach intraperitonealer und intramuskulärer (30) Injektion bei der weißen Maus untersucht und stets positiv gefunden. Dem gegenüber zeigten Kulturabschwemmungen in der serologischen Kapselreaktion nur zum Teil deutlich ausgeprägte Schleimkapseln.

7. Die epidemiologischen Konsequenzen aus den erhobenen Befunden wurden unter Bezugnahme auf die einschlägige Literatur diskutiert.

Abb. 1

Übersicht über die Fundorte und die Herkunft der Proben im
Stadtkreis Würzburg.



Abb. 3 :

Isolierung von *C. neoformans* aus Vogelkot auf NKAD



Im Bild : Ausschnitt aus Sproßpilzmischrasen mit den deutlich dunkelpigmentierten *C. neoformans*-Kolonien

Abb.2 :

Isolierung von *C. neoformans* aus Vogelkot auf NKAD



Im Bild : die dunkelpigmentierten *C. neoformans*-Kolonien sind in dem Sproßpilz-Schimmelpilz- Mischrasen deutlich zu erkennen.

Herrn Professor Dr. med. H.P.R. S e e l i g e r danke ich für die
Überlassung des Themas und die unermüdliche Unterstützung bei der
Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. et Dr. med. vet. F. S t a i b bin ich
für seine guten Ratschläge zu großem Dank verpflichtet.

VI. LITERATURVERZEICHNIS.

1. Ajello, L. : Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Soils. *Am.J.Hyg.* 67, 72-77 (1958)
2. Beijerinck, M. W.: L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. *Arch. néerl.Sci.* 23, 367-372 (1889)
3. Bergman, F. : Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Sweden. *Acta med. Scand.* 174, 651-655 (1963)
4. Buschke, A. : Über eine durch Coccidien hervorgerufene Krankheit des Menschen. *Dtsch.med.Wschr.* 21, 14 (1895)
5. Busse, O. : Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. *Zbl.Bakt., 1.Orig.* 16, 175-180 (1894)
6. Christensen, W.B. : Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J.Bact.* 52, 461-466 (1946)
7. Emmons, Ch.W. : Saprophytic source of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon. *Am.J.Hyg.* 62, 227-232 (1955)
8. Emmons, Ch.W. : Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Pub. Health Rep. Wash.* 75, 662-664 (1960)
9. Frey, D. und Durie. E.B. : The isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil in New Guinea and pigeon droppings in Sidney, New South Wales. *Med J.Aust.* 1, 947-949 (19)
10. Kao, C.J. und Schwarz, J. : The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon nests. With remarks on the identification of virulent *Cryptococci*. *Am.J. Clin.Path.* 27, 652-663 (1957)
11. Littman, M.L. und Schneierson, S.S. : *Cryptococcus neoformans* in pigeon exkreta in New York City. *Am.J.Hyg.* 69, 49-59 (1959)
12. Littman, M.L. und Zimmerman, L.E. : *Cryptococcosis*. Grune and Stratton, New York / London (1956)
13. Lodder, J. and N.J.W. Kreger-vanRij: *The Yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: North Holland Publ.Comp. (1952)
14. Partridge, B.M. and Winner, H.L. : *Cryptococcus neoformans* in bird droppings in London. *Lancet* 2, 1060 (1965)

15. Pieritz, D. : Untersuchungen zum Vorkommen von *Cryptococcus neoformans* in Taubenexkrementen. Inauguraldissertation, Köln (1965)
16. Procknow, J.J., Benfield, J.R., Rippon, J.W., Diener, C.F. and Archer, F.L. *Cryptococcus hepatitis* presenting as a surgical emergency. First isolation of *Cryptococcus neoformans* from point source in Chicago. J.Am.Med.Ass. 191, 269-274 (1966)
17. Randhawa, H.S., Clayton, Y.M. and Riddel, J.W. : Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon habitats in London. Nature London, 208, 801 (1965)
18. Schabinski, G. : Grundriss der medizinischen Mykologie. G. Fischer, Jena (1960)
19. Schirren, C. und Rieth, H. : Hefepilze als Krankheitserreger bei Mensch und Tier. Vorträge und Diskussionsbemerkungen der 2. wissenschaftl. Tag. der Dtschspr. Myk. Ges. in Hamburg am 18.3.1962
20. Schneidau, J.D. : Pigeons and Cryptococcosis. Science, 143, 525-526 (1964)
21. Seeliger, H.P.R. : Cryptococcose. Med. Mittlg. Schering 19, 69-77 (1958)
22. Seeliger, H.P.R. : Mykologische Serodagnostik. Beitr. z. Hyg. Epidemiol. Heft 11, Barth, Leipzig (1959)
23. Seeliger, H.P.R. : Das kulturell-biochemische und serologische Verhalten der *Cryptococcus*-Gruppe. Ergebn. Mikrobiol., 32, 23-72 (1959)
24. Seeliger, H.P.R. : Use of urease test for the screening and identification of *Cryptococci*. J. Bact. 72, 127-131 (1956)
- 24a. Seeliger, H.P.R. : Zum derzeitigen Stand der mykologischen Serodagnostik. Arch. für Hyg. und Bakt. 151 Heft 5/6 (1967)
25. Seeliger, H.P.R., und Staib, F. : Klinisch-epidemiologische Probleme der Cryptococcose. Fortschr. der Med. 84, 436-440 (1966)
26. Shields, A.B. und Ajello, L. : Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science 151, 208-209 (1966)
27. Silva, M.E. und Paula, L.A. : Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e minhos de Pombos em Salvador, Bahia. (Brasil) Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 5, 9-11 (1963)
28. Staib, F. : Vorkommen von *Cryptococcus neoformans* im Vogelmist. Zbl. Bakt., 1. Orig. 182, 562-563 (1961)
29. Staib, F. : Vogelkot ein Nährsubstrat für die Gattung *Cryptococcus*. Zbl. Bakt. 1. Orig. 186, 233-247 (1962)

30. Staib, F. : Cryptococcus neoformans im Muskelgewebe. Zbl.Bakt., Par., Infekt.und Hygiene 1.Orig. 185, 135-144 (1962)
31. Staib, F. : Cryptococcus neoformans und Guizotia abyssinica.Z.Hyg. 148, 466-475 (1962)
32. Staib, F. : Membranfiltration und Negerfaat (Guizotia abyssinica)-Nährboden für den Cryptococcus neoformans Nachweis.Z.Hyg. 149, 329-335 (1963)
33. Staib, F. : Zur Widerstandsfähigkeit von Cryptococcus neoformans gegen Austrocknung und hohe Temperaturen.Mikrobiol. 44, 323-333 (1963)
34. Staib, F. : Zur Kreatinin-Kreatin-Assimilation in der Hefepilzdiagnostik.Zbl.Bakt.,Par., Infekt. und Hyg.1.Orig. 191, 429-432 (1963)
35. Staib, F. : New concepts in the occurrence and identification of Cryptococcus neoformans.Myco-pathologia 19, 143-145 (1963)
36. Staib, F. : Zur Cryptococcose bei Mensch und Tier unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens von Cryptococcus neoformans im Vogelmist. Tierärztl.Umschau 19, 69-72 (1964)
37. Staib, F. und Seeliger, H.P.R. : Negerfaat-Kreatinin-Agar als Basis eines Selektivmediums zum Nachweis von Cryptococcus neoformans.Vortrag,5.wissenschaftl. Tagung der Deutschspr.Mykol.Gesellsch. München, 17./18.Juli 1965
38. Staib, F. und Seeliger, H.P.R. : Un nouveau milieu sélective pour l'isolement du Cryptococcus neoformans des matières faecales et du sol. Ann.Inst.Pasteur, 110, 792 (1966)
39. Walter, J.E. and Atchison, R.W.: Epidemiological and Immunological Studies of Cryptococcus neoformans.J.Bact. 92, 82-87 (1966)
40. Wiebecke, B. und Staib, F. : Generalisierte Cryptococcose. Münch.Med. Wschr. 107, 361-365 (1965)
41. Yamamoto, S., Ishida, K. und Sato, A. : Isolation of Cryptococcus neoformans from pulmonary granuloma of a cat and from pigeon droppings.Jap.J.Vet.Sci. 19, 179-191 (1957)

L e b e n s l a u f

Ich, Gerd Bethäuser, wurde am 31. 5. 1939, als Sohn des Zahnarztes Dr. Erich Bethäuser und seiner Ehefrau Anna, geb. Schillinger, in Tauberbischofsheim geboren.

Von meinem 6. bis 10. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule in Großrinderfeld, Landkreis Tauberbischofsheim. Danach wurde ich in das Matthias-Grünwald Gymnasium in Tauberbischofsheim aufgenommen, wo ich im März 1960 das Reifezeugnis ablegte.

Nach Aufnahme an der Bayer. Julius-Maximilians-Universität in Würzburg begann ich hier das Studium der Zahnmedizin. Nach Ablauf von 6 vorklinischen Semestern bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung. Mein klinisches Studium begann im Sommer-Semester 1963 und endete im Februar 1966 mit Abschluß des Staatsexamens.

Danach betätigte ich mich in der Praxis meines Vaters als Assistent bis zum Juni 1967. Seit dieser Zeit leiste ich bei der Bundeswehr meine Wehrpflicht als Stabsarzt ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Gerd Bethäuser

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Burkarderstraße 9

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Burkarderstraße 9